

⑫ 公開特許公報 (A) 昭62-166897

⑬ Int. Cl.

C 12 P 21/00
 A 61 K 39/395
 C 07 K 15/04
 C 12 N 5/00
 15/00
 G 01 N 33/53
 33/577
 //C 12 P 21/00
 C 12 R 1:91

識別記号

厅内整理番号
 6712-4B
 7252-4C
 8318-4H
 7115-4B
 7115-4B
 D-7906-2G
 7906-2G

⑭ 公開 昭和62年(1987)7月23日

審査請求 未請求 発明の数 3 (全5頁)

⑮ 発明の名称 核内非ヒストン蛋白質に対するモノクローナル抗体

⑯ 特願 昭61-7833

⑯ 出願 昭61(1986)1月20日

⑰ 発明者 常岡 誠 東京都世田谷区赤堤1丁目23番17号

⑰ 発明者 内田 駿 豊中市上新田1丁目24番地 B-701号

⑯ 出願人 東洋曹達工業株式会社 新南陽市大字富田4560番地

⑯ 出願人 内田 駿 豊中市上新田1丁目24番地 B-701号

明細書

1 発明の名称

核内非ヒストン蛋白質に対するモノクローナル抗体

2 特許請求の範囲

- (1) 核内非ヒストン蛋白質ハイモビリティーグループ-1と共に細胞質から核に移行するモノクローナル抗体。
- (2) 核内非ヒストン蛋白質ハイモビリティーグループ-1と共に細胞質から核に移行することのできるモノクローナル抗体の產生能を持つクローン化されたハイブリドーマ細胞。
- (3) 核内非ヒストン蛋白質ハイモビリティーグループ-1で免疫した哺乳動物の抗体產生細胞と骨髓細胞との間にハイブリドーマを形成させ、該ハイブリドーマをクローン化して核内非ヒストン蛋白質ハイモビリティーグループ-1に対する抗体を選択し、該クローンを哺乳動物腹腔内又は培地内で増殖させ該哺乳動物腹水中又は培地中に抗核内非ヒストン蛋白質ハイモビリティーグループ-

1 抗体を產生させ、これを分離回収することを特徴とする核内非ヒストン蛋白質ハイモビリティーグループ-1に対するモノクローナル抗体の製造法。

3 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

本発明は核内非ヒストン蛋白質ハイモビリティーグループ-1に対するモノクローナル抗体に関するものであり、更に詳しくは核内非ヒストン蛋白質ハイモビリティーグループ-1 (以下HMG-1と略称する) に特異的なモノクローナル抗体、このモノクローナル抗体を產生することのできるクローン化されたハイブリドーマ細胞及びこのモノクローナル抗体の製造方法に関するものである。HMG-1は均一に精製され、アミノ酸配列も知られている数少ない非ヒストン蛋白質の一つである。HMG-1は様々なタイプの動物の様々なタイプの細胞でその存在が認められている。またDNAやヒストンH-1等と結合する性質を持ち、ヌクレオソームのリンカーリージョンに局在する。

HMG-1の生物学的な機能として細胞の核内でのRNAの転写、或いはDNAの複製等に関与しているといわれている。また、HMG-1は細胞の細胞質内に導入された時、直に核に移行する性質が知られている。

ほとんどすべての遺伝情報は核中に保存されており、物質を用いて直接それに影響を与えるためには、まずその物質が核中に移行することが重要である。細胞質から核に、HMG-1と共に移行していくモノクロナル抗体は、RNAへの転写、DNAの複製等の核内の機能を調べるために有用である。また、HMG-1量を直接測定することに関する有用である。また、HMG-1を精製する際にも有用な手段を提供する。

【従来の技術】

脾臓細胞と骨髓腫細胞とのハイブリドーマは文献中に記載されている。例えば Kochler et al., *Nature* 258, 435(1975) 及び Bur. J. Immunol. 511 (1976)、Milstein et al., *Nature*, 288, 550(1977) 等があげられる。それ以来、ヒトイン

ドーマクロロンを培養及びクローン化してHMG-1に特異性を示す抗体を産生するクローンとして選択されるものである。

HMG-1としては、ヒト、ウシ等の高等動物の組織又は細胞由来のものを用いることができる。

HMG-1を抗原として使用するため、HMG-1を精製する。HMG-1の精製に関しては文献に記載されている。ここでは「Sanders, C., *Biochim. Biophys. Acta.*, 73, 1034 - 1042 (1977)」の方法を用いることができる。精製されたHMG-1はその抗原性を高めるため「Garroy, J. S. et al., *Methods in Immunology: A Laboratory Text for Instruction & Research*, 3rd Ed., 153 - 158, Addison-Wesley Publishing Co., Reading MA」の方法を用いて化学的に修飾することができる。修飾されたHMG-1は、生理食塩水、或いは緩衝液などに溶解し、例えばマウス又はラットの場合一匹あたり一回に10~100μgを投与するのが好ましい。免疫操作は数回にわけて行なうが、最後の

スリン(特開昭60-57253)、インターロイキン2(特開昭60-51121)等を抗原とした単クローニ性抗体が多數報告されている。

ところで、HMG-1と共存する場合に細胞質から核に移行する性質を持つ抗体HMG-1モノクローナル抗体は従来報告されていない。

【問題を解決するための手段】

本発明はHMG-1に対して特異性を示すモノクローナル抗体及びこのモノクロナル抗体を産生することのできるハイブリドーマクローン及び該クローンが産生する抗体HMG-1モノクローナル抗体を提供するものである。

本発明のモノクローナル抗体はIgA等のイムノグロブリンからなる。

本発明のハイブリドーマクローンは骨髓腫細胞とトリニトロフェノール(以下TNPと略称する)などの修飾剤により化学的に修飾されたHMG-1で免疫された哺乳動物、特にマウス、ラット等の脾臓又はリンパ節の細胞中に存在する抗体産生細胞とのハイブリドーマを作成し、このハイブリ

免疫操作をのぞいてアジュバントと共に行なわれる。免疫は1~2週間の間隔で行ない、最終免疫はアジュバントを使用せず、生理食塩水などに溶解し腹腔内或いは静脉内に投与する。免疫動物としては一般にはラット及びマウスが般用される。これは細胞融合に使用する腫瘍細胞株によって決められる為で、マウスの中でも免疫グロブリンを産生しないBALB/cがよく用いられる。最終免疫2~4日後にリンパ節或いは脾臓を摘出し、得られたリンパ球を細胞融合に供する。

一方細胞融合に使用される腫瘍細胞株としては、免疫グロブリンを産生しないP3-X63-Ag8-U1やSP2/o-Ag14などが使用される。細胞融合時にはリンパ球を腫瘍細胞の5~20倍量多く用いるのが適当である。DMEM培地、RPMI1640培地或いは、生理食塩水で洗浄後、リンパ球と腫瘍細胞を遠心操作でペレット状態にする。ペレットをほぐした後、ポリエチレンギリコール(以下PEGと略称する)を加え、細胞融合を行なうが、通常はPEGの平均分子量

1,000~8,000の40~60%溶液を0.5~2ml使用する。融合促進剤としてPEG添加時にジメチルスルホキシドなどを少量加えることも有効である。PEG溶液を細胞に添加し、融合反応を1~10分間程度行なった後、D MEM培地或いはRPMI 1640培地などを10~50ml徐々に加え反応を停止する。融合反応停止後直ちに遠心し、上清を除去する。牛胎児血清(以下FCSと略称する)を5~20%含むD MEM培地或いはRPMI 1640培地に細胞を懸滴し、96穴培養プレートにリンパ球が1穴あたり $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 個となるよう分注する。次にヒボキサンチン($1 \times 10^{-4}M$)、チミジン($1.6 \times 10^{-5}M$)、アミノブテリン($4 \times 10^{-7}M$)を含むD MEM培地(或いはRPMI 1640培地)、即ちHAT培地に換えていく。HAT培地交換の方法は一般には、翌日培養プレートにはじめに分注した容量と当容量加え、その後、2~3日毎にHAT培地で半量ずつ交換する。融合後10~14日目にアミノブテリ

ンを除いたHAT培地で2~3日毎に培養液交換を続ける。融合細胞(ハイブリドーマ)の増殖のさかんな穴の培養上清を種々の分析法、例えばRIA、ELISA等で目的の抗体産生ハイブリドーマを選択する。得られた抗HMG-1抗体値をもつ抗体を産生するハイブリドーマを次にクローニングする。クローニングには塞天培地でコロニーをひろう方法、限界希釈法などがある。どの方法を用いてもクローニングは2回以上くり返し、完全に單一クローランとする。確立したクローランは、その細胞を *in vitro* 又は *in vivo* で培養することによって单クローラン性抗HMG-1抗体が得られる。目的とするモノクローナル抗体はこのようなクローランを培養した培養上清から塩析、イオン交換クロマトグラフィー等の精製操作により回収できる。また抗HMG-1産生ハイブリドーマを組織適合性動物の腹腔内に移植し、増殖させ、該動物の腹水中に産生されたモノクローナル抗体を精製回収することもできる。

本方法によりヒト型のHMG-1と結合しうる

モノクローナル抗体を作成することができる。

また本方法により分子量約90万のIgM、16万前後の他のタイプのイムノグロブリンを作成することができる。

【作用】

本発明のモノクローナル抗体は抗原-抗体反応によりHMG-1と結合させて複合体を形成させることができる。この複合体は細胞中に注入されたとき、核膜を透過して核内に移行する。

細胞質中に物質を注入する方法は、マイクロビペットを用いて直接細胞内に注入する方法(Grässmann, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US, 73, 380 (1976)、赤血球ゴーストを利用する方法(Ilirosava, M. et al., Nature 249, 449 (1974))等が知られている。この時、物質をあらかじめ、ラジオアイソトープあるいは蛍光色素等で標識しておくと、その物質の細胞内での局在を知ることができる。標識された物質を細胞質中に注入後、一定時間後、細胞を細胞質画分と核画分とに分け、その画分中の標識物質の量を定量する

ことにより、物質の細胞内での局在を知ることができる。細胞の分画の方法は文献『Yamazumi, M. et al., Nature 273, 782-784 (1978)』にある。ここで開発した抗HMG-1モノクローナル抗体だけ単独で細胞質に注入される場合は、細胞質から核への標識物の移行は観察されないが、該モノクローナル抗体をあらかじめ抗原であるHMG-1と共に混合し、充分反応させてから細胞質中に注入すると標識物は核中に移行する現象が観察される。

以下に実施例により本発明を詳細に説明する。

実施例 1

文献『Garvey, J. S. et al., Methods in Immunology: A Laboratory Text for Instruction & Research, 3rd Ed., 153-158 Addison-Wesley Publishing Co., Reading MA』に従い、ウシ型HMG-1(ウシ胸腺由来)、1分子に対し、6分子のTNP分子を化学的に結合させたTNP修飾HMG-1蛋白質50μgを完全フロ

イントアジュvantとませ、8週令のBALB/cマウスに腹腔内注射した。10日後に不完全フロイントアジュvantとませた該蛋白質50μgを10日毎に6回注射した。最後の感作後10日後に50μgのHMG-1蛋白質によりブーストした。4日後該マウスから脾臓細胞を取り出し、4.5% (V/V) PEG 4,000, 1.5% (V/V)ジメチルスルホキジを用いてSP2/0細胞と細胞融合した。細胞融合後、細胞を96穴培養プレートに分注し、HAT培地中で培養した。該細胞を14日間HAT培地中で増殖させ、ついで徐々にHT培地にうつした。抗体産生ハイブリドーマの選択はRIAによりなされた。すなわち0.2mg/mlのHMG-1でコートされた後2%子ウシ血清でコートされたポリビニルクロライドマイクロタイターブレートを生理食塩水で洗浄した後、ハイブリドーマ培養上清100μlをマイクロタイターブレートの穴の中に入れ40℃、一夜放置した。該ブレートを生理食塩水で洗浄後¹²⁵Iで標識した抗マウスIgGウサギIgGFabフラグ

メントを加え、室温で4時間放置した。該ブレートを再び生理食塩水で洗浄後完全に乾かし、カウントにより、ラジオアクティビティを測定した。ラジオアクティビティの陽性のハイブリドーマすなわち抗HMG-1抗体を産生しているハイブリドーマを限界希釈法により2回クローニングし、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。

本操作により3株の陽性ハイブリドーマ、FR-1, FR-2及びFR-3を得た。

こうして得たハイブリドーマ、FR-1株を5匹のBALB/cマウス腹腔内に注射し、10日後にモノクローナル抗体を含む腹水10mlを得た。得られた腹水10mlを遠心し上清を集め、0.7倍容の10.0%饱和硫酸を加えた後、10分間4℃、2000×gで遠心した。沈殿を4.0%饱和硫酸で3回洗浄し、10mMEDTA溶液に溶解し、2.0mMリン酸緩衝液(pH8.0)に対して透析した。透析後、2.0mMリン酸緩衝液(pH8.0)で平衡化されたDEAEセルロースカラムにより

分離した。すなわち、2.0mMから0.3Mのリン酸緩衝液の直線濃度勾配をかけ、蛋白質を分離した。1.5mgの抗HMG-1モノクローナル抗体が0.2Mリン酸緩衝液付近で溶出してきた。

二次元拡散法により精製したFR-1産生抗体はIgAタイプであることが確認された。また1.5×8.0cmのセファデックスG-200によるカラムクロマトグラフィーにより分子量を推定したが、FR-1産生モノクローナル抗体は分子量約15万のIgGと同一画分に回収され、その分子量は約17万と推定された。

精製したこのモノクローナル抗体は抗原として用いたウシ型HMG-1だけでなく、ヒト型のHMG-1とも結合した。すなわちヒト培養細胞、FL細胞から精製したHMG-1を¹²⁵Iで標識し、精製したこのモノクローナル抗体をセファロースに結合し、免疫沈殿法を行ったところラジオアクティビティはセファロースとの沈殿に移行した。

実施例2

¹²⁵Iで標識された抗HMG-1モノクローナル抗体をHMG-1と共に又はHMG-1なしで4℃一夜放置した後、赤血球ゴースト法により、FL細胞に注入した。すなわち、1.4μg/mlの¹²⁵Iで標識された抗HMG-1モノクローナル抗体と2.2mg/mlのHMG-1とを含む赤血球ゴーストあるいは、1.4μg/mlの該モノクローナル抗体と2.2mg/mlの卵アルブミンを含む赤血球ゴーストをセンダイウイルスを用いて、同数のFL細胞と融合した。融合後、細胞混合液は、10%の子ウシ血清を含むMEM培地（以下10CS-MEMと略称する）で3回洗った後、さらに融合していない赤血球ゴーストを完全に除くため15.5mM NH₄Cl、1.0mM K₂CO₃、1mM Na₂-EDTA (pH7.0) 溶液中に懸滴し、0℃で7分間放置した。さらに一度FL細胞を10CS-MEMで洗った後、10CS-MEM中で培養した。

融合、30分、1時間、6時間後に細胞をトリプシンとEDTAを用いて浮遊させ回収した。該

細胞を 2.0 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5.0 mM Tris (pH 7.6) 溶液を用いて一回洗った後、 0.5% Triton X-100, 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1.0 mM Tris (pH 7.4) 溶液中でホモジナイズし、遠心し、上清と沈殿に分けた。上清を細胞質画分、沈殿を核画分として用いた。¹²⁵I 標識モノクローナル抗体を HMG-1 と共に FL 細胞に注入した時には 30 分後に注入したラジオアクティヴィティーの 15% が核画分中に存在し、1 時間後には約 25% にまで増え、そのまま 6 時間後までその状態は続いた。一方 ¹²⁵I 標識モノクローナル抗体だけで細胞に導入した場合は、導入したラジオアクティヴィティーの 2~3% のみが核画分にあるだけであった。本実施例により本発明のモノクローナル抗体が単独ではなく HMG-1 とともに核内に移行することが証明された。

【発明の効果】

本発明のモノクローナル抗体は核内非ヒストン蛋白質と複合体を形成し核膜を通過して核内に移

行することができるので、核内非ヒストン蛋白質の細胞内、特に核膜近傍でのこの蛋白質の挙動を調べるために有用であり、細胞レベルでの生体の診断用の試薬として有用であると考えられる。

特許出願人東洋製薬工業株式会社

同 内田 譲

ENGLISH TRANSLATION of
Japanese Patent Laid-Open No. Sho 62-166897

Laid-Open Date: July 23, 1987

Application No. Sho 61-7833

Filing Date: January 20, 1986

Applicants: TOYO SODA MFG CO., LTD.

Takeshi UCHIDA

1 TITLE OF THE INVENTION

MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST INTRANUCLEAR
NONHISTONE PROTEIN

2 CLAIMS

(1) A monoclonal antibody which migrates from a cytoplasm to a nucleus together with an intranuclear nonhistone protein high-mobility group-1.

(2) A cloned hybridoma cell which is capable of producing a monoclonal antibody capable of migrating from a cytoplasm to a nucleus together with an intranuclear nonhistone protein high-mobility group-1.

(3) A method for producing a monoclonal antibody against an intranuclear nonhistone protein high-mobility group-1, comprising the steps of:

forming a hybridoma between an antibody-producing cell of a mammal immunized with the intranuclear nonhistone protein high-mobility group-1 and a myelomatous cell;

cloning the hybridoma to select an antibody against the intranuclear nonhistone protein high-mobility group-1;

proliferating an obtained clone in a mammalian abdominal cavity or in a culture medium to produce an antibody against the intranuclear nonhistone protein high-mobility group-1 in mammalian ascites or in the culture medium; and

separating and recovering the antibody.

3 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[Industrial Field of Application]

The present invention relates to a monoclonal antibody against an intranuclear nonhistone protein high mobility group-1, and more particularly to a monoclonal antibody which is specific to an intranuclear nonhistone protein high mobility group-1 (hereinafter abbreviated to HMG-1), a cloned hybridoma cell which is capable of producing the monoclonal antibody and a method for producing the monoclonal antibody.

HMG-1 is one of the few nonhistone proteins which are purified uniformly and whose amino acid sequences are known. HMG-1 has been found in various types of cells of various kinds of animals. HMG-1 has a property of binding to a DNA, a histone H-1 or the like, and is localized in a linker region of a nucleosome. A biological function of an HMG-1 is believed to be involved in transcription to RNA, DNA replication or the like in the nucleus of a cell. Also, HMG-1 has been known to have a property of migrating directly into the nucleus when introduced into the cytoplasm of a cell.

Since almost all the genetic information is stored in a nucleus, it is firstly important to allow the substance to migrate into the nucleus in order to directly affect the information using a substance. A monoclonal antibody which migrates together with HMG-1 from a cytoplasm to a nucleus is useful in investigating the intranuclear function such as transcription to RNA, DNA replication and the like. In addition, it is also useful in determining the HMG-1 content directly. Moreover, it provides a useful means for purifying HMG-1.

[Prior Art]

A hybridoma of a splenocyte and a myelomatous cell is described in references, such as Koehler et al., *Nature* 256, 435 (1975), *Eur. J. Immunol.* 5 11 (1976), Milstein et al., *Nature*, 266, 550 (1977) and the like. Since then, subsequent references also have been reported many monoclonal antibodies to antigens such as human insulin (Japanese

Patent Laid-Open No. Sho 60-57253) and interleukin-2 (Japanese Patent Laid-Open No. Sho 60-51121).

However, an anti-HMG-1 monoclonal antibody having a property of migrating from a cytoplasm into a nucleus has not been reported when coexisting with an HMG-1.

[Means to Solve the Problems]

The present invention provides a monoclonal antibody exhibiting the specificity to an HMG-1, a hybridoma clone capable of producing the monoclonal antibody and an anti-HMG-1 monoclonal antibody produced by the clone.

The monoclonal antibody of the present invention comprises an immunoglobulin such as IgA.

The hybridoma clone of the present invention is selected as a clone which produces an antibody exhibiting the specificity to an HMG-1 by preparing hybridomas of myelomatous cells and antibody-producing cells in the spleen or the lymph node of a mammalian animal, in particular, a mouse, a rat or the like, immunized with an HMG-1 modified chemically with a modifier such as trinitrophenol (hereinafter abbreviated to TNP) followed by culturing and cloning the hybridoma clones.

The HMG-1 may, for example, be one derived from a tissue or cell of a higher animal such as a human and a bovine.

In order to use an HMG-1 as an antigen, the HMG-1 is purified. Purification of an HMG-1 is described in a reference. A method employed herein can be one described in Sanders, C., *Biochim. Biophys. Acta* 73, 1034-1042 (1977). The purified HMG-1 can be modified chemically for the purpose of enhancing its antigenicity, using a method described in Garrey, J. S. et al., *Methods in Immunology; A Laboratory Text for Instruction & Research*, 3rd Ed., 153-158, Addison - Wesley Publishing Co., Reading MA. It is preferable that the modified HMG-1 is dissolved in, for example, physiological saline or a buffer, and given in a dose of 10 to 100 µg to each animal in the case of a mouse or a rat. The immunization procedure is accomplished in several steps, and conducted with an adjuvant except for the final immunizing step. The immunization is performed at an interval of about one to two weeks. In the final

immunizing step, the HMG-1 is dissolved in physiological saline or the like without any adjuvant, and injected intraperitoneally or intravenously. While an animal to be immunized is generally a mouse or a rat, it is determined in accordance with the tumor cell line employed for cell fusion, and a BALB/c mouse which does not produce immunoglobulins is employed frequently among mice. Two to four days after the final immunization, the lymph node or the spleen is taken out and the lymphocytes obtained are subjected to cell fusion.

The tumor cell lines employed for cell fusion are for example P3-X63-Ag8-U1 and SP2/o-Ag14 which do not produce immunoglobulins. It is appropriate that lymphocytes are used preferably in an amount of 5- to 20-fold excess of myelomatous cells in performing cell fusion. After washing with a DMEM medium, an RPMI 1640 medium or physiological saline, the lymphocytes and the tumor cells are pelletized by centrifugation. After loosening the pellets, a polyethylene glycol (hereinafter abbreviated to PEG) is added to carry out cell fusion. A PEG having a mean molecular weight of 1,000 to 8,000 is usually employed in a volume of 0.5 to 2 ml as a 40 to 60% solution. It is also advantageous to add a small amount of dimethyl sulfoxide as a fusion accelerator upon adding the PEG. After adding the PEG solution to the cells and conducting the fusion reaction for 1 to 10 minutes, 10 to 50 ml of a DMEM medium or an RPMI 1640 medium is added portionwise to terminate the reaction. Immediately after completing the fusion reaction, the mixture is centrifuged to remove a supernatant. The cells are suspended in a DMEM medium or an RPMI 1640 medium containing 5 to 20% fetal calf serum (hereinafter abbreviated to FCS), and poured into a 96-well culture plate at a cell density of 1×10^5 to 5×10^6 lymphocytes per well. Then the medium is replaced portionwise with a HAT medium, which is a DMEM medium (or an RPMI 1640 medium) containing hypoxanthine (1×10^{-4} M), thymidine (1.6×10^{-5} M) and aminopterin (4×10^{-7} M). The replacement with the HAT medium is performed usually by adding an HAT medium on the following day in a volume equal to an initially poured volume to the culture plate followed by replacing a half volume with the HAT medium at an interval of two to three days. On the 10th to 14th day after the fusion, the replacement with an HT medium without aminopterin is continued at an interval of 2 to

3 days. A culture supernatant exhibiting a vigorous proliferation of a fusion cell (hybridoma) in a well is analyzed by various methods such as RIA and ELISA, whereby selecting the intended antibody-producing hybridoma. The resultant hybridoma which produces an antibody having an anti-HMG-1 antibody titer is then cloned for example by a method of picking a colony up from an agar medium or by a limiting dilution method. The cloning is repeated twice or more in any of the methods, whereby establishing a monoclonal. The clone thus established is subjected to an *in vitro* or *in vivo* culturing, whereby obtaining the monoclonal anti-HMG-1 antibody. The intended monoclonal antibody can be recovered by a purification method such as salting out or ion exchange chromatography from the culture supernatant of the clone culture described above. Also, the anti-HMG-1-producing hybridoma is implanted intraperitoneally to a tissue-compatible animal to allow the hybridoma to proliferate therein, whereby the monoclonal antibody produced in the ascites of the animal can be purified and isolated.

According to the present method, a monoclonal antibody capable of binding to a human HMG-1 can be produced.

Also, according to the present method, IgM whose molecular weight is about 900,000 and other types of immunoglobulins whose molecular weights are around 160,000 can be produced.

[Function]

The monoclonal antibody of the present invention can form a complex by binding to an HMG-1 by an antigen-antibody reaction. The complex, when being injected into a cell, penetrates through the nuclear membrane and migrates into the nucleus.

A method for injecting a substance into a cytoplasm may for example be a direct injection into a cell using a micropipette (Graessmann, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US, 73, 366 (1976)) or a method utilizing an erythrocyte ghost (Hirosawa, M. et al., Nature 249, 449 (1974)). In such method, the localization of the substance in a cell can be distinguished by labeling the substance previously with a radioisotope or a

fluorescent pigment. At a certain time after injecting the labeled substance into a cytoplasm, the cell is separated into the cytoplasmic fraction and the nuclear fraction. The amount of the labeled substance is quantified for each of the fractions, whereby investigating the localization of the substance in the cell. The method for fractionation of a cell is described in Yamaizumi, M. et al., *Nature* 273, 782-784 (1978). While no migration of a labeled substance from a cytoplasm into a nucleus is observed when the anti-HMG-1 monoclonal antibody developed herein alone is injected into the cytoplasm, the phenomenon of migration of a labeled substance into a nucleus can be observed when the monoclonal antibody is previously mixed with an antigen HMG-1 to carry out a sufficient reaction prior to injection into a cytoplasm.

The present invention is described in detail by the following Examples.

EXAMPLE 1

According to the description by Garvey, J.S. et al., *Methods in Immunology: A Laboratory Text for Instruction & Research*, 3rd Ed., 153-158, Addison-Wesley Publishing Co., Reading MA, one molecule of a bovine HMG-1 (derived from bovine thymus) was bound chemically to 6 molecules of TNP to form a TNP-modified HMG-1 protein, and 50 µg of the protein was mixed with complete Freund's adjuvant and injected intraperitoneally to a 8 week-old BALB/c mouse. After 10 days, the injection of 50 µg of the same protein mixed with incomplete Freund's adjuvant was injected 6 times at an interval of 10 days. 50 µg of the HMG-1 protein was given as a booster 10 days after the final sensitization. After 4 days, splenocytes were taken out from the mouse, and subjected to cell fusion with SP2/0 cells using 45% (W/V) PEG 4,000 and 15% (W/V) dimethyl sulfoxide. After the cell fusion, the cells were poured into a 96-well culture plate and cultured in an HAT medium. The cells were proliferated for 14 days in the HAT medium, and then transferred gradually into an HT medium. An antibody-producing hybridoma was selected by RIA. Specifically, a polyvinyl chloride microtiter plate coated with 0.2 mg/ml of the HMG-1 and then with 2% fetal calf serum was washed with physiological saline. Thereafter, the wells were filled with 100 µl of a hybridoma culture supernatant, and allowed to stand at 40°C overnight. After the plate

was washed with physiological saline, ^{125}I -labeled anti-mouse IgG rabbit IgG Fab fragments were added, and then allowed to stand at room temperature for 4 hours. The plate was washed again with physiological saline and dried completely, and the radioactivity was determined using a γ -counter. A radioactivity-positive hybridoma, i.e. a hybridoma producing the anti-HMG-1 antibody, was cloned twice by a limiting dilution method, whereby obtaining a hybridoma producing the monoclonal antibody according to the present invention.

Three positive hybridomas, namely, FR-1, FR-2 and FR-3 were obtained by the procedure described above.

One of the resultant hybridomas, FR-1, was injected intraperitoneally to five BALB/c mice, and 10 ml of an ascites containing the monoclonal antibody was obtained after 10 days. 10 ml of the ascites obtained was centrifuged to collect the supernatant, and a 0.7-fold volume of 100%-saturated ammonium sulfate was added thereto, and then centrifuged at 4°C and 2000 x g for 10 minutes. The precipitate was washed three times with a 40%-saturated ammonium sulfate, dissolved in 10 mM EDTA, and dialyzed against 20 mM phosphate buffer (pH 8.0). After the dialysis, a separation was conducted on a DEAE cellulose column equilibrated with 20 mM phosphate buffer (pH 8.0). Specifically, a protein was separated using a linear concentration gradient from 20 mM to 0.3 M phosphate buffer. 15 mg of the anti-HMG-1 monoclonal antibody was eluted at about 0.2 M phosphate buffer.

An FR-1-producing antibody purified by a two-dimensional diffusion method was confirmed to be of IgA type. A column chromatography on Sephadex G-200 (1.5 x 80 cm) was employed for deducing the molecular weight. The FR-1-producing monoclonal antibody and IgG whose molecular weight was about 150,000 were recovered in the same fraction. The molecular weight of the monoclonal antibody was deduced to be about 170,000.

The purified monoclonal antibody bound not only to bovine HMG-1 employed as an antigen but also to human HMG-1. Specifically, when HMG-1 purified from human cultured cells, i.e., FL cells, was labeled with ^{125}I , and the purified monoclonal antibody was bound to Sepharose to perform an immunoprecipitation, which resulted in

transfer of radioactivity to the precipitation with Sepharose.

EXAMPLE 2

The ^{125}I -labeled anti-HMG-1 monoclonal antibody was allowed to stand at 4 °C overnight with or without the HMG-1, and then injected into FL cells by an erythrocyte ghost method. Specifically, an erythrocyte ghost containing 1.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of the ^{125}I -labeled anti-HMG-1 monoclonal antibodies and 2.2 mg/ml of the HMG-1 or an erythrocyte ghost containing 1.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of the monoclonal antibodies and 2.2 mg/ml of ovalbumin was subjected to fusion with FL cells in the same cell number using Sendai virus. After the fusion, the cell mixture was washed three times with a 10% fetal calf serum-containing MEM medium (hereinafter abbreviated to 10 CS-MEM), suspended in a solution of 155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 1mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (pH 7.0) and allowed to stand at 0 °C for 7 minutes in order to completely remove the non-fused erythrocyte ghost. The FL cells were washed again with 10CS-MEM, and then cultured in 10CS-MEM.

30 minutes, 1 hour and 6 hours after the fusion, the cells were suspended in trypsin and EDTA and then recovered. The cells were washed once with a solution of 20 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 50 mM Tris (pH 7.6), and then homogenized in a solution of 0.5% Triton X-100, 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM Tris (pH 7.4), centrifuged to separate into the supernatant and the precipitate. The supernatant was employed as a cytoplasmic fraction, and the precipitate was employed as a nuclear fraction. When the ^{125}I -labeled monoclonal antibody was injected together with the HMG-1 into the FL cells, 15% of the injected radioactivity was present in the nuclear fraction after 30 minutes, which was increased to as high as about 25% of the radioactivity present after 1 hour, and maintained at that level for 6 hours. On the other hand, the ^{125}I -labeled monoclonal antibody introduced alone into the cells resulted in only 2 to 3% of the introduced radioactivity present in the nuclear fraction. This example demonstrated that the monoclonal antibody of the present invention migrates together with HMG-1 rather than alone into a nucleus.

[Effects of the Invention]

Since the monoclonal antibody according to the present invention can migrate into the nucleus by forming a complex with an intranuclear nonhistone protein and penetrating through the nuclear membrane, the monoclonal antibody is useful in investigating the behavior of the intranuclear nonhistone protein in a cell, especially near the nuclear membrane, so that the monoclonal antibody of the present invention is considered to be useful as a reagent for a diagnosis of a living body on a cellular basis.

Applicants: TOYO SODA MFG CO., LTD.
Takeshi UCHIDA